



# 谷子类受体蛋白激酶基因 *SiRLK35* 在水稻中对盐胁迫的响应

李小波<sup>1, 2</sup>, 李臻<sup>2</sup>, 戴绍军<sup>3</sup>, 潘教文<sup>2</sup>, 王庆国<sup>2</sup>, 管延安<sup>4, 5</sup>, 丁国华<sup>1</sup>, 刘炜<sup>2, 5</sup>

(<sup>1</sup> 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; <sup>2</sup> 山东省农业科学院生物技术研究中心/山东省作物遗传改良与生理生态重点实验室, 济南 250100; <sup>3</sup> 上海师范大学生命与环境科学学院/植物种质资源开发协同创新中心, 上海 200234; <sup>4</sup> 山东省农业科学院作物研究所/山东省特色作物工程实验室, 济南 250100; <sup>5</sup> 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

**摘要:**【目的】盐胁迫影响作物的产量和品质, 而作物的耐盐性受特定基因的调控。在前期获得谷子类受体蛋白激酶基因 *SiRLK35* 过表达水稻株系的基础上, 拟结合植株在盐胁迫下的表型, 对部分盐胁迫指标及响应基因的表达模式进行检测和验证, 解析谷子 *SiRLK35* 参与盐害响应的可能机制。【方法】选取谷子 *SiRLK35* 过表达水稻株系, 分别为过表达株系 (over-expression, OE) -1 (OE-1)、OE-2 和 OE-3, 以野生型中花 11 为对照, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测各株系中 *SiRLK35* 的表达情况; 分别用含 0、150 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 MS 培养液处理三叶期的对照及转基因株系幼苗, 观察其表型, 统计 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 后苗长及根长; 用 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理四叶期幼苗, 统计处理 14 d 后材料干重、死亡率和死叶率, 对各材料的耐盐性进行评价; 进一步挑选 *SiRLK35* 过表达程度高且耐盐表型好的 OE-1 株系, 利用 3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-Diaminobenzidine, DAB) 和氮蓝四唑 (nitro tetrazolium blue chloride, NBT) 染色检测其胁迫下过氧化物积累及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 的活性; 并对部分盐害响应基因的表达模式进行检测。【结果】谷子 *SiRLK35* 在株系 OE-1 中的相对表达量最高; 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 幼苗后, 中花 11 苗长和根长的生长受抑制程度均大于 *SiRLK35* 过表达株系, 其中 OE-1 的受抑制程度最小; 四叶期幼苗经 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 14 d 后, 转基因株系地上部和地下部干重降低幅度均低于对照, 且幼苗死亡率和死叶率均低于对照; 盐胁迫下对照过氧化染色反应明显, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累均高于过表达植株, SOD 和 POD 抗氧化酶活性均高于对照; 部分盐害响应基因在 *SiRLK35* 过表达株系中表现为上调, 其中, *OsLEA3* 在盐处理 24 h 的相对表达量是对照中的 1.9 倍。【结论】谷子 *SiRLK35* 异源转化水稻获得的过表达株系对盐胁迫具有一定的抗性, *SiRLK35* 可通过调控抗氧化酶活性及相关信号途径, 从而参与盐害响应。

**关键词:** 谷子; *SiRLK35*; 耐盐性; 抗氧化酶; 盐胁迫响应基因

## Response of Receptor-Like Protein Kinase Gene *SiRLK35* of Foxtail Millet to Salt in Heterologous Transgenic Rice

LI XiaoBo<sup>1,2</sup>, LI Zhen<sup>2</sup>, DAI ShaoJun<sup>3</sup>, PAN JiaoWen<sup>2</sup>, WANG QingGuo<sup>2</sup>, GUAN YanAn<sup>4,5</sup>, DING GuoHua<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2,5</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025; <sup>2</sup> Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100; <sup>3</sup> College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University/Development Center of Plant Germplasm Resources, Shanghai 200234; <sup>4</sup> Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Engineering Laboratory for Featured Crops, Jinan 250100; <sup>5</sup> College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014)

收稿日期: 2019-07-02; 接受日期: 2019-09-19

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-06-13.5-A19)、山东省农业科学院农业科技创新工程 (CXGC2018E13)、山东省农业科学院青年英才计划 (2016—2018)

联系方式: 李小波, E-mail: 1670065759@qq.com. 通信作者刘炜, E-mail: wheiliu@163.com. 通信作者丁国华, E-mail: hsdgh@hrbnu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 Salt stress affects the crop yield and quality, while the crop salt tolerance is regulated by specific genes. Using heterogeneous over-expressed rice lines (OE-1, OE-2, and OE-3) of foxtail millet receptor-like protein kinase gene *SiRLK35*, the possible mechanisms of *SiRLK35* under salinity will be dissected on phenotypic, physiological and molecular levels. 【Method】 The expressions of *SiRLK35* in OE-1, OE-2, and OE-3 were analyzed by qRT-PCR. The phenotypes of three-leaf stage seedlings treated with 0, 150 and 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl were observed, and the lengths of seedlings and roots were measured after treated with 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 3 days. The dry weights, death rate and dead leaf rate of four-leaf stage seedlings that treated with 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 14 days were also measured. OE-1 with the highest *SiRLK35* expression was further used for DAB and NBT dyeing analysis. The activities of partial antioxidases, and expression patterns of marker genes were detected. 【Result】 There was the highest *SiRLK35* expression level in OE-1. The growth of control and OE seedlings were all inhibited under 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl. The decreased levels of dry weight, the death rate and dead leaf rate of OE rice were all lower than those of the control, together with the less accumulation of O<sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the higher activities of antioxidases under salinity. Partial of salt responsive genes were up-regulated in *SiRLK35* OE lines, especially the *OsLEA3* was induced about 1.9 times higher after treated with NaCl for 24 h. 【Conclusion】 *SiRLK35* OE rice lines have tolerance under salinity, and the gene *SiRLK35* of foxtail millet could participate in salt response by regulation the activities of antioxidases and related signal pathways.

**Key words:** foxtail millet (*Setaria italica* L.); *SiRLK35*; salt tolerance; antioxidase; salt responsive genes

## 0 引言

【研究意义】盐胁迫是一种典型的非生物胁迫,是影响农作物生长发育和产量的主要因素之一<sup>[1]</sup>。盐胁迫能够打乱植物体内正常的离子分布和动态平衡,破坏细胞内代谢过程,导致细胞内活性氧积累、细胞膜过氧化、生物大分子破坏,最终抑制植物的生长发育,甚至引起植物死亡<sup>[2]</sup>。据统计,世界盐碱地面积已达  $9.54 \times 10^8$  hm<sup>2</sup>,占可耕地面积的 10%。中国拥有盐碱地  $9.913 \times 10^4$  hm<sup>2</sup>,占耕地面积的 20%<sup>[3]</sup>。盐碱地作为中国重要的后备土地资源,因其土壤质量差、生产效率低而大面积荒芜,导致这些地区农业生产不足,严重制约其区域经济发展<sup>[4]</sup>。因此,研究农作物耐盐机制、培育抗逆耐盐新品种,是农业研究者的重大责任。谷子 (*Setaria italica* L.) 作为中国特色杂粮作物,具有 C<sub>4</sub> 光合途径、耐贫瘠、抗逆性强等特点,近年来已逐渐成为研究 C<sub>4</sub> 和抗旱抗逆的模式作物<sup>[5]</sup>。鉴定谷子抗逆基因及其功能对于作物遗传改良及抗逆品种培育具有重要意义。【前人研究进展】类受体蛋白激酶 (lectin receptor-like protein kinase, LecRLKs) 是植物中最大的基因家族,在调控植物的生长发育、抗逆及抗病等方面发挥重要作用<sup>[6]</sup>。其中,凝集素类受体蛋白激酶 (LecRLKs) 参与盐胁迫响应的报道较多<sup>[7]</sup>。位于质膜系统中的豌豆凝集素类受体蛋白激酶基因 *PsLecRLK* 在盐胁迫条件下表达明显上调,其可通过增强下游水通道蛋白基因表达来提高过表达株系的吸水能力,从而减少 ROS 的积累,提高过表达株系的

抗盐性<sup>[8]</sup>。水稻基因 *SITI* 是一种主要在根表皮细胞中表达并介导盐敏感的 *LecRLK*,参与盐胁迫信号的感知和传导。盐胁迫激活 *SITI* 表达,通过磷酸化 MAPK3/MAPK6,促进乙烯的合成并增加了活性氧的积累,进而导致植株在盐胁迫下生长受抑制甚至死亡<sup>[9]</sup>。通过抑制 *SITI* 的表达和降低 *SITI* 的活性,可明显提高植物的耐盐性。除 *LecRLKs* 外,其他类型的 RLK 基因也参与盐胁迫响应。*PnRLK-1* 是南极苔藓中的一种细胞质型类受体蛋白激酶,在盐处理下, *PnRLK-1* 能够上调一系列 ROS 清除基因如 *AtAPX1*、*AtZAT10* 和 *AtCAT1* 的表达,从而减少 ROS 积累,提高植物对盐胁迫的耐受性<sup>[10]</sup>。*OsRMC* 是水稻中发现的富含半胱氨酸的类受体蛋白激酶,是水稻盐胁迫应答中的负调控因子,其转录受 2 个 AP2/ERF 转录因子 *OsEREBP1* 和 *OsEREBP2* 的负调控<sup>[11]</sup>。近年来,也有对谷子抗盐基因的研究报道,如谷子液泡 H<sup>+</sup>-ATPase E 亚基基因 *SiVHA-E* 可通过正向调控 ABA 信号途径以及减少植株体内 Na<sup>+</sup> 积累和水分散失,从而显著提高拟南芥耐盐性<sup>[12]</sup>;黄锁等<sup>[13]</sup>发现谷子核转录因子基因 *SiNF-YA5* 能够提高拟南芥中盐胁迫应答基因 *NHX1* 和 *LEA7* 的表达,且主要通过 ABA 非依赖途径提高转基因植物对盐胁迫的耐性;秦玉海等<sup>[14]</sup>发现谷子 *SibZIP42* 转基因拟南芥株系在种子萌发时期耐盐性显著提高,推测 *SibZIP42* 可能通过 ABA 信号途径正向调控植物的耐盐性;谷子基因 *SiASR4* 在植物抵抗干旱和盐胁迫中发挥着重要作用,其表达受 DREB 类转录因子 *SiARDP* 调控,通过 ABA 信号

通路参与植物对非生物胁迫的响应过程<sup>[15]</sup>。谷子 *SiRLK35* (NCBI 登录号: XM\_004956247.2) 是作物逆境生物学研究组前期以谷子豫谷 1 号为材料, 通过 iTRAQ 技术筛选到的一个干旱响应的类受体蛋白激酶基因。该基因编码蛋白含有 392 个氨基酸, 包含一个 S-TKc 保守结构域以及一个 TFS2N 结构域, 含 3 个跨膜结构域, N 端有信号肽。通过构建双元植物表达载体 pCambia1301P-*SiRLK35*, 已获得基因过表达水稻株系, 初步分析显示该基因可提高转基因水稻的抗盐性<sup>[16-17]</sup>, 参与植物的抗逆响应。

【本研究切入点】近年来, 谷子作为一种新型模式作物受到广泛关注, 但有关谷子耐盐基因的鉴定及相关机制研究鲜有报道。开展该方面研究对于解析谷子抗盐、耐逆机制, 开展作物耐盐品种的改良及选育具有重要意义。【拟解决的关键问题】本研究通过对盐害下谷子 *SiRLK35* 异源转化获得的过表达水稻株系表型观察及鉴定, 明确 *SiRLK35* 在作物盐胁迫响应中的作用, 并对其参与机制深入解析, 为改良及培育作物耐盐品种提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

作物逆境生物学研究组构建并获得谷子 *SiRLK35* 过表达转基因水稻株系 OE-1、OE-2 和 OE-3<sup>[16-17]</sup>, 其种子及水稻品种中花 11 种子均由作物逆境生物学研究组保存。分别挑选籽粒饱满的种子于培养皿中浸泡至露白, 再移至广口玻璃瓶于 28℃、相对湿度 75%、光照周期 (光照 16 h/黑暗 8 h) 的人工气候培养箱培养至三叶期。

### 1.2 过表达株系的鉴定及谷子 *SiRLK35* 的转录分析

取生长至三叶期各株系水稻幼苗叶片, -80℃ 保存备用。在 DNA 水平对过表达株系的转基因阳性进行鉴定。参照 *SiRLK35* 全长序列, 利用 Primer Premier 5 设计引物, 以水稻 *ACTIN* (LOC\_Os03g50885) 为内参, 利用荧光定量 PCR 检测 *SiRLK35* 在过表达株系中的相对表达量, 引物序列见表 1。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *SiRLK35* 在各过表达株系中的相对表达量。

### 1.3 盐胁迫下转基因植株的表型分析及干重测定

前期研究显示谷子 *SiRLK35* 为盐诱导表达<sup>[16]</sup>。将生长至三叶期的 OE-1、OE-2、OE-3 及中花 11 幼苗, 分别置于含有 0、150 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 MS 培养液中进行处理, 每个处理 20 株, 设 3 个重复, 对各材料在不同盐浓度下的生长情况进行观察、测量及拍

照记录。取生长至三叶期的 OE-1、OE-2、OE-3 及中花 11 幼苗在 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d, 分别测量苗长及根长, 每组测量 30 株, 重复 3 次, 比较盐处理前后植株的生长状况。

将沙培生长至四叶期的 OE-1、OE-2、OE-3 及中花 11 幼苗用 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 MS 培养液处理, 每天补充 1/2 MS 培养液, 每 3 天换一次溶液, 处理 14 d 后, 分别统计盐处理后幼苗的死亡率 (盐处理后死苗数占总苗数的百分比) 和死叶率 (盐处理后枯死叶片数占总叶片数的百分比), 并进一步将材料的地上部和地下部在 105℃ 杀青 0.5 h, 于 80℃ 烘至恒重, 测定盐处理前后各株系幼苗及根部干重, 每组设 3 个重复。

### 1.4 过氧化物的检测、抗氧化酶活性的测定

参照 2014 年 KUMAR 等<sup>[18]</sup>的方法进行过氧化物的染色测定。剪取 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 后的 OE-1 和对照中花 11 幼苗叶片, 分别用 DAB 和 NBT 染色液进行染色, 经抽真空处理后染色过夜, 之后加入 95%乙醇煮沸 10 min 进行脱色, 观察并拍照。

参照 2011 年 YU 等<sup>[19]</sup>的方法进行抗氧化酶活性测定。用 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理转基因株系 OE-1 和中花 11 三叶期幼苗叶片, 分别于处理后 0、6、12 和 24 h 各取 0.5 g, 每个处理设 3 个重复, 置于研钵中, 加入 5 mL 4℃ 预冷的提取液和少量石英砂研磨, 然后转移至 10 mL 离心管中, 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性。

### 1.5 盐胁迫响应基因的表达模式分析

用 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理转基因株系 OE-1 和中花 11 三叶期幼苗, 分别于处理后 0、6、12 和 24 h 取叶片, 经液氮速冻, 于 -80℃ 保存备用。

通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索水稻中盐胁迫响应基因 *OsP5CS*、*OsLEA3*、*OsNHX1*、*OsHKT1*、*OsNAC6* 和 *OsDREB2A*, 并下载其全长序列, 设计特异性引物进行 qRT-PCR 分析 (表 1)。反应在 ABI PRISM7900HT (Applied Biosystem) 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应体系为 20 μL, 反应条件为 95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 56℃ 20 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量, 检测基因在盐处理前后各株系中的相对表达量。

表 1 基因信息及特异性引物

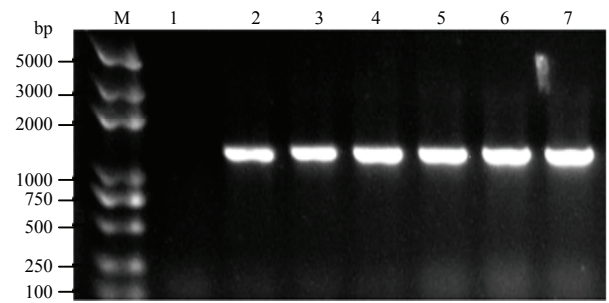
Table 1 Genes information and specific primers

| 基因名称 Gene name  | 登录号 Accession number | 正向引物 Forward primer (5'-3') | 反向引物 Reverse primer (5'-3') |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>OsACTIN</i>  | MS971743.1           | TCGGCTACAACCCTGACAA         | CAAACTTGACGGCAATGTGG        |
| <i>SiRLK35</i>  | XM_004956247.2       | AAATAGTTGGGTAGACGAGG        | TACGCAGATGATTGACAGAT        |
| <i>OsP5CS</i>   | D49714.1             | CTATTCCTCGTAATGTTGG         | CTTAGTTGACGCCTTGAT          |
| <i>OsLEA3</i>   | Z68090.1             | ACAAGGACACCTCTGCCACC        | AATAGACCCAAAGGGAAATCA       |
| <i>OsNHX1</i>   | AB021878.1           | GAGAGGAGCTGTGTCGATTG        | CTCTCGAGGTCAGAACCTTG        |
| <i>OsHKT1</i>   | KU501218.1           | ACCATAAGCACAAACCCAG         | AATCCTAAGAACCACCTCA         |
| <i>OsNAC6</i>   | AB028185.1           | GATCATGCACGAGTACCGC         | GCACCCAATCATCCAACCT         |
| <i>OsDREB2A</i> | JQ341059.1           | GCTGAGATCCGTGAACCA          | ACCATACATTGCCCTTGC          |

2 结果

2.1 谷子 *SiRLK35* 阳性转基因纯合株系的获得

通过进一步对谷子 *SiRLK35* 过表达水稻株系 OE-1、OE-2 和 OE-3 的 T<sub>4</sub> 代材料进行 PCR 检测（图 1）。结果显示，在各过表达株系中均获得 1 208 bp 的特异性条带，与谷子 *SiRLK35* 预期大小一致，而对照中未检测到阳性条带，表明基因已整合入各水稻株系基因组中；且各株系种子在 40%潮霉素下均可正常萌发并生长，经 T<sub>1</sub> 至 T<sub>3</sub> 多代筛选，植株表型不再发生分离，获得 *SiRLK35* 纯合转基因株系。



M: Trans2K Plus DNA Marker; 1: 对照中花 11; 2—3: OE-1; 4—5: OE-2; 6—7: OE-3  
M: Trans2K Plus DNA Marker; 1: Zhonghua 11; 2-3: OE-1; 4-5: OE-2; 6-7: OE-3

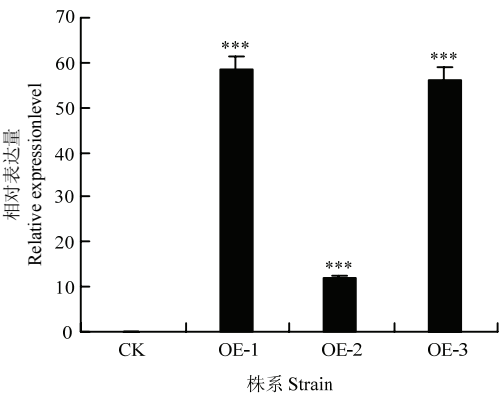
图 1 *SiRLK35* 阳性转基因株系的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR verification of *SiRLK35* transgenic rice

2.2 *SiRLK35* 在各转基因株系中的表达分析

通过对 *SiRLK35* 在各转基因株系中的表达进行 qRT-PCR 检测（图 2），结果显示，在各转基因株系中，*SiRLK35* 的表达程度较高，且在 OE-1 株系的相对

表达量最高，OE-3 次之，OE-2 中的表达最低，而在对照中几乎检测不到 *SiRLK35* 的表达，与对照相比，*SiRLK35* 在各转基因株系中的相对表达量差异显著。



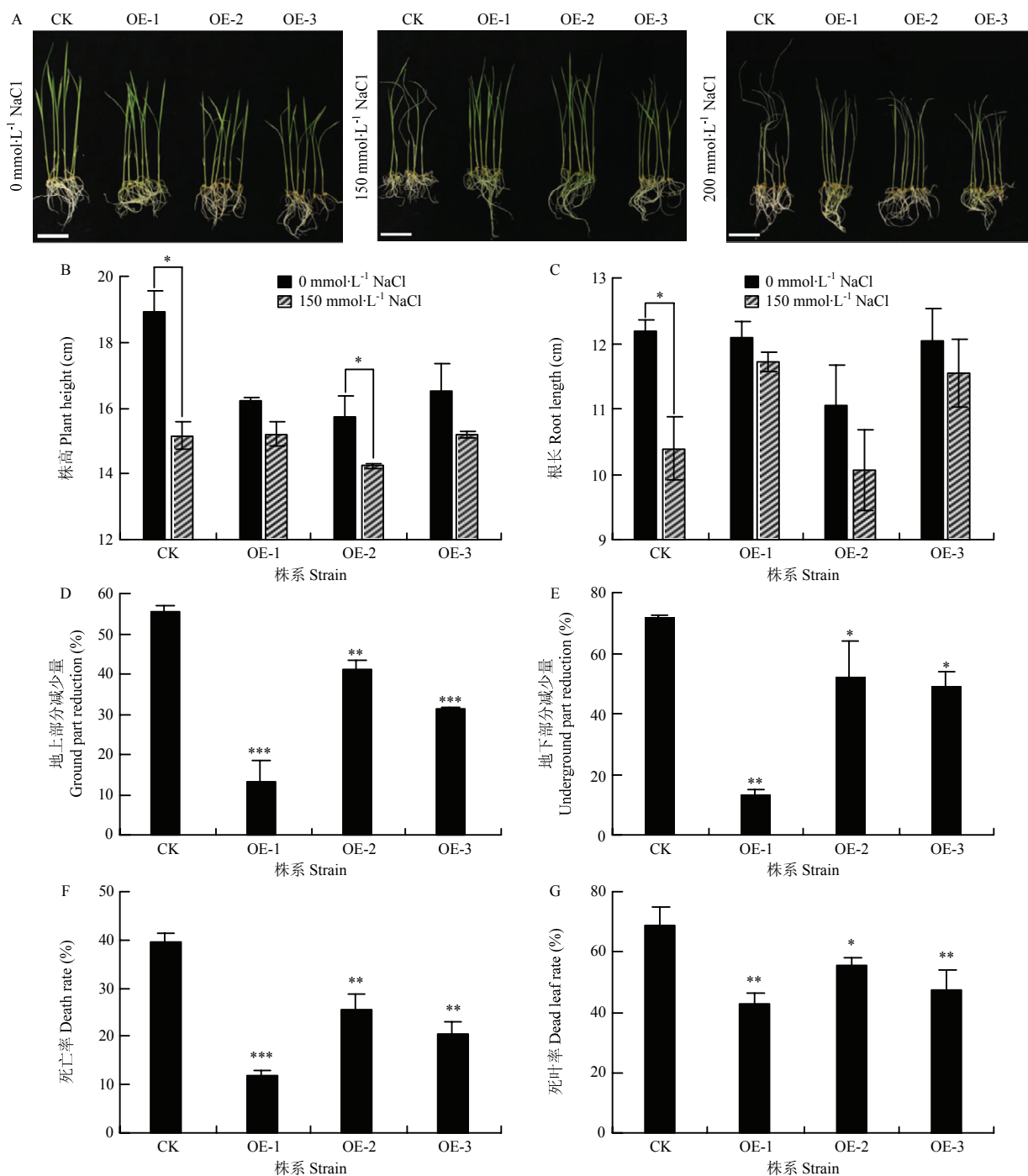
\*\*\*: 与水稻中花 11 相比，OE 水稻各株系中 *SiRLK35* 的相对表达量在  $P<0.001$  水平上差异显著 ( $n=3$ )。下同  
\*\*\*: Indicates that compared with Zhonghua11, the relative expression levels of *SiRLK35* in OE rice lines were significantly different at  $P<0.001$  ( $n=3$ ). The same as below

图 2 *SiRLK35* 在对照及各株系中的表达情况

Fig. 2 The relative expression levels of *SiRLK35* in control and transgenic rice lines

2.3 *SiRLK35* 过表达株系的耐盐性检测

对照及 *SiRLK35* 过表达株系 OE-1、OE-2、OE-3 分别经 0、150 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 2 d 后，其幼苗的生长均被不同程度地抑制（图 3-A）。但在相同 NaCl 浓度下，过表达转基因株系的生长状况明显优于对照。在 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 2 d 后，对照失水严重，出现叶片皱缩卷曲，茎部变细，叶片持绿程度降低并黄化，抗倒伏能力下降，表现出明显受害



A: 0、150 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 2 d 后各株系表型, 标尺=5 cm; B: 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 后各株系的株高; C: 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 后各株系的根长; D: 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 14 d 后各株系地上部分单株干重相对减少量; E: 0 和 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 14 d 后各株系地下部分单株干重相对减少量; F: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 14 d 后各株系的死亡率; G: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 14 d 后各株系的死叶率; \*在  $P < 0.05$  水平上差异显著 ( $n=3$ ); \*\*在  $P < 0.01$  水平上差异显著 ( $n=3$ )。下同

A: The phenotypes of control and transgenics treated with 0, 150 and 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 2 days, Bar=5 cm; B: Plant height of control and transgenics treated with 0 and 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 3 days; C: Root length of control and transgenics treated with 0 and 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 3 days; D: Relative reduction of dry weight in the above-ground part of control and transgenics treated with 0 and 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 14 days; E: Relative reduction of dry weight in underground parts of control and transgenics treated with 0 and 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 14 days; F: Death rate of control and transgenics treated with 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 14 days; G: Dead leaf rate of control and transgenics treated with 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 14 days; \* significantly different at  $P < 0.05$  level ( $n = 3$ ); \*\* significantly different at  $P < 0.01$  level ( $n = 3$ ). The same as below

图 3 对照及 *SiRLK35* 过表达株系耐盐能力检测

Fig. 3 Salt-resistance detection of control and *SiRLK35* transgenic rice lines

症状, 而 *SiRLK35* 过表达株系材料失水不明显, 茎部虽变细但仍具有一定的韧性, 尤其是株系 OE-1 较为明显; 各材料在  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理 2 d 后, 对照和 *SiRLK35* 过表达株系均受害严重, 黄化程度高、失水明显、植株整体细弱。对照及转基因株系的地上部与地下部生长均受盐胁迫的抑制 (图 3-B 和图 3-C), 其中, 地上部分相对受抑制程度分别为 19.78% (对照)、6.12% (OE-1)、9.36% (OE-2) 和 8.24% (OE-3); 地下部分相对受抑制程度分别为 14.63% (对照)、3.09% (OE-1)、8.92% (OE-2) 和 3.98% (OE-3); 对照受抑制程度均明显大于 *SiRLK35* 转基因株系, 但 OE-1 及 OE-3 的幼苗及根部在盐处理前后长度均差异不显著。

将沙培长至四叶期的对照及 *SiRLK35* 转基因幼苗在  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理 14 d 后, 对各株系地上部干重、地下部干重进行测定及统计, 并计算处理后对照组与处理组单株地上部干重的相对减少量 (图 3-D)、地下部干重的相对减少量 (图 3-E), 显示对照和各转基因株系地上及地下部干重均减少, 其中, 地上部分干重相对减少量分别为 55.45% (对照)、13.32% (OE-1)、41.08% (OE-2) 和 31.23% (OE-3); 而地下部分干重相对减少量分别为 71.78%、13.29%、52.26% 和 49.27% (OE-3); 对照经盐处理后地上及地下部的干重减少最明显, 各转基因株系经盐处理后地上及地下部的干重也均有不同程度的减少, 但整体受影响程度均低于对照; 统计  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理后各株系的死亡率 (图 3-F) 和死叶率 (图 3-G), 其中死亡率分别为 39.56% (对照)、11.78% (OE-1)、25.49% (OE-2) 和 20.45% (OE-3); 死叶率分别为 68.69% (对照)、42.86% (OE-1)、55.69% (OE-2) 和 47.53% (OE-3); 显示中花 11 的死亡率和死叶率均比转基因株系高, 且转基因株系中 OE-1 的死亡率和死叶率均低于其他转基因株系, 说明转基因株系中 OE-1 受盐胁迫的影响最小。

#### 2.4 活性氧含量和抗氧化酶活性分析

利用 NBT 和 DAB 染色法, 对对照及  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理 3 d 后的 OE-1 株系中  $\text{O}_2^{\cdot -}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行染色, 检测各材料中过氧化物的积累情况。结果显示, 盐胁迫下对照叶片经 NBT 染色呈显著的蓝色, 而在 DAB 染色下为深褐色, 而 OE-1 株系叶片在不同染色下则表现为淡蓝色或基本不着色, 显示对照中  $\text{O}_2^{\cdot -}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累量均高于 OE-1 株系 (图 4-A)。而在正常生长条件下, 对照及转基因材料中均检测不到明显的  $\text{O}_2^{\cdot -}$

和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

对盐处理前后 SOD 和 POD 的活性测定 (图 4-B 和图 4-C), 结果显示, 盐处理后中花 11 的 SOD 活性下降, OE-1 的 SOD 活性先上升后下降, 且在盐处理后 6 h 达到最高; 盐处理后 POD 的活性在中花 11 中先上升后下降, 在 OE-1 中表现为盐处理后 6 h 下降, 之后上升, 且处理 24 h 表现为显著上升。

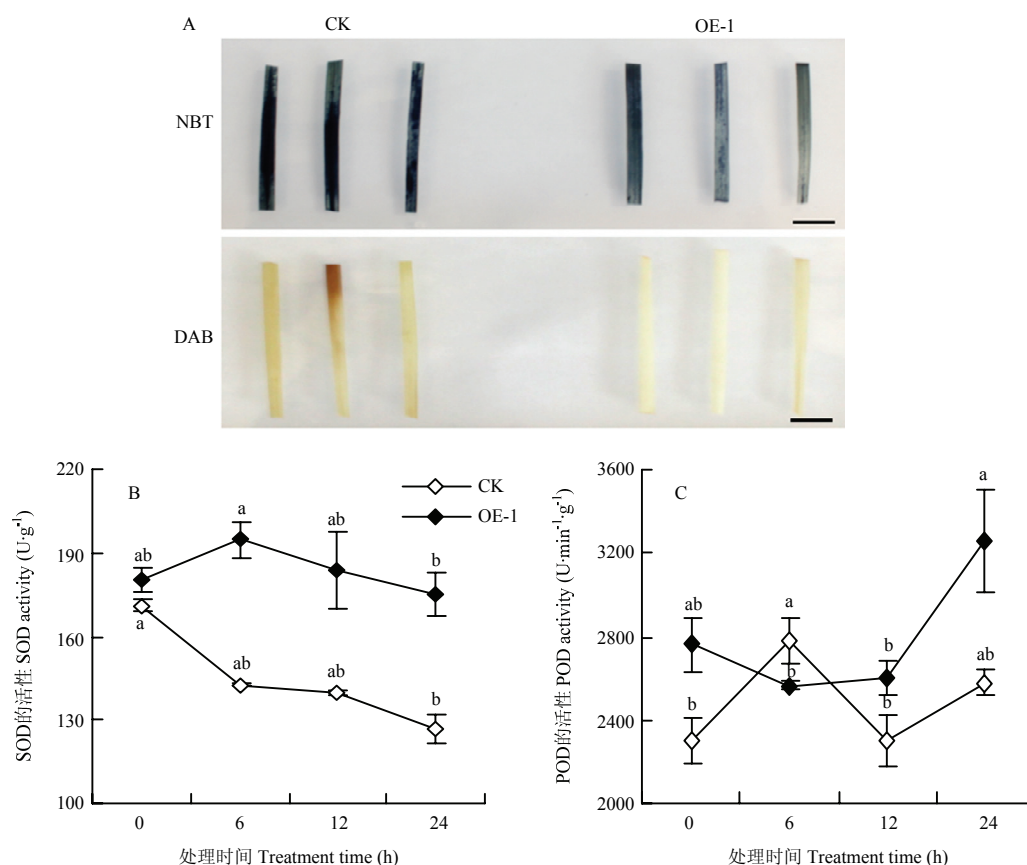
#### 2.5 盐处理下各响应基因的表达模式

对盐处理前后对照及 *SiRLK35* 过表达株系 OE-1 中部分已知盐响应基因如 *OsP5CS*、*OsLEA3*、*OsNHX1*、*OsHKT1*、*OsNAC6* 和 *OsDREB2A* 的表达进行了检测 (图 5)。结果显示, 经  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理后, *OsP5CS*、*OsLEA3*、*OsNHX1*、*OsNAC6* 和 *OsDREB2A* 在对照中花 11 和 OE-1 转基因株系中表达均上调, 其中, *OsLEA3* 的表达上调明显, 在对照中该基因的表达上调约 249 倍, 而在 OE-1 中该基因的表达在盐处理 24 h 后上调约 470 倍, 该基因表达上调程度明显高于对照 (图 5-B); *OsHKT1* 在盐处理 6 h 后, 在对照和 OE-1 中的表达量均有提高, 之后随盐处理时间的延长则表达量下降, 在盐处理 24 h 表达量降至最低, 且在 OE-1 株系中该基因的相对表达量较对照低 (图 5-D)。

### 3 讨论

土壤中含盐量过多、造成土壤溶液渗透压过高引起植物生长发育不良的现象称为盐害。盐害可产生离子胁迫, 渗透胁迫及过氧化胁迫, 通过破坏细胞中离子平衡, 从而抑制酶的活性以及营养物质的供应, 干扰细胞中离子代谢, 造成过氧化物积累, 并降低植物叶绿素含量, 进而影响光合作用的正常进行, 最终导致植物生长发育受抑制甚至死亡<sup>[20-21]</sup>。植物具有固着生长的特性, 在进化过程中必须形成适应高盐等极端环境的应对机制才可以生存。植物通过感知环境变化, 从而对相关基因的表达进行调控来响应盐胁迫。植物的耐盐性受多基因控制, 属于数量性状遗传<sup>[22]</sup>。目前, 已从拟南芥、烟草、水稻、玉米等植物中分离和鉴定出大量耐盐相关基因, 包括部分转录因子及功能基因, 主要在渗透调节、离子转运等方面发挥作用, 部分基因功能及盐胁迫信号转导途径也得到了解析和验证<sup>[23]</sup>。其中类受体蛋白激酶作为植物中最大的一类基因家族, 主要参与信号转导、抗病及抗逆反应, 对植物生长发育具有重要意义<sup>[6,24]</sup>。作物逆境生物学实验室前期通过检索胁迫下谷子的蛋白表达谱, 鉴定到一个





A: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 3 d 后对照及 OE-1 叶片的 DAB 和 NBT 染色, 标尺=1cm; B: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理后对照及 OE-1 的 SOD 活性; C: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理后对照及 OE-1 的 POD 活性; 不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ) ( $n=3$ )

A: DAB and NBT staining analysis of control and OE-1 after 3 day of NaCl treatment, Bar=1cm; B: SOD activity analysis of control and OE-1 after salt treatment; C: POD activity of control and OE-1 after salt treatment; the different letters above the curve indicate significant difference ( $P<0.05$ ) of different treatments( $n=3$ )

图 4 盐处理后对照及 OE-1 的活性氧和抗氧化酶活性测定

Fig. 4 Detection of reactive oxygen and antioxidant enzyme activities of control and OE-1 after salt treatment

胁迫响应基因, 其编码 S-类受体蛋白激酶, 将其命名为 *SiRLK35*<sup>[17]</sup>。前期研究中, 对其在干旱、盐胁迫、GA、ABA、MeJA 等处理下的表达模式进行了分析, 结果显示, 胁迫及激素处理均可不同程度地诱导 *SiRLK35* 的表达, 显示该基因可能参与谷子的抗逆过程<sup>[16]</sup>。

### 3.1 *SiRLK35* 过表达株系的耐盐性分析

本研究以谷子 *SiRLK35* 异源转化水稻获得的过表达株系可响应盐胁迫的研究结果为基础, 从生理、生化结合分子生物学机制等多角度对基因如何调控作物耐盐性进行解析。前期研究显示, 在盐胁迫下对照和 *SiRLK35* 的 OE 水稻幼苗生长均受到抑制并表现出一系列如黄化、发育迟缓等受害症状<sup>[25]</sup>, 但过表达株系受抑制程度较小, 显示 *SiRLK35* 异源转

化水稻幼苗具有一定的耐盐性。本研究结合盐处理前后株高、根长、干重变化、死亡率及死叶率等各项指标测定, 显示盐害下 *SiRLK35* 转基因株系生长受抑制程度均低于对照, 其中, OE-1 受抑制的程度最小。鉴于基因表达程度与其功能呈正相关, 结合 3 个过表达株系中 *SiRLK35* 在 OE-1 中表达最高, 显示 OE-1 抗盐性高于其他 2 个株系。盐害下过量的过氧化氢积累导致过氧化胁迫, 从而对植物造成伤害。为应对盐胁迫, 植物通过启动自身的抗氧化酶系统来清除 ROS, 从而达到缓解伤害的目的。NBT 和 DAB 染色、及 SOD 和 POD 活性均显示抗性较强的 OE-1 株系在盐害下 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累程度低于对照、且对活性氧的清除能力较高, *SiRLK35* 及其高表达可使植物产生并提高抗盐能力<sup>[26]</sup>。

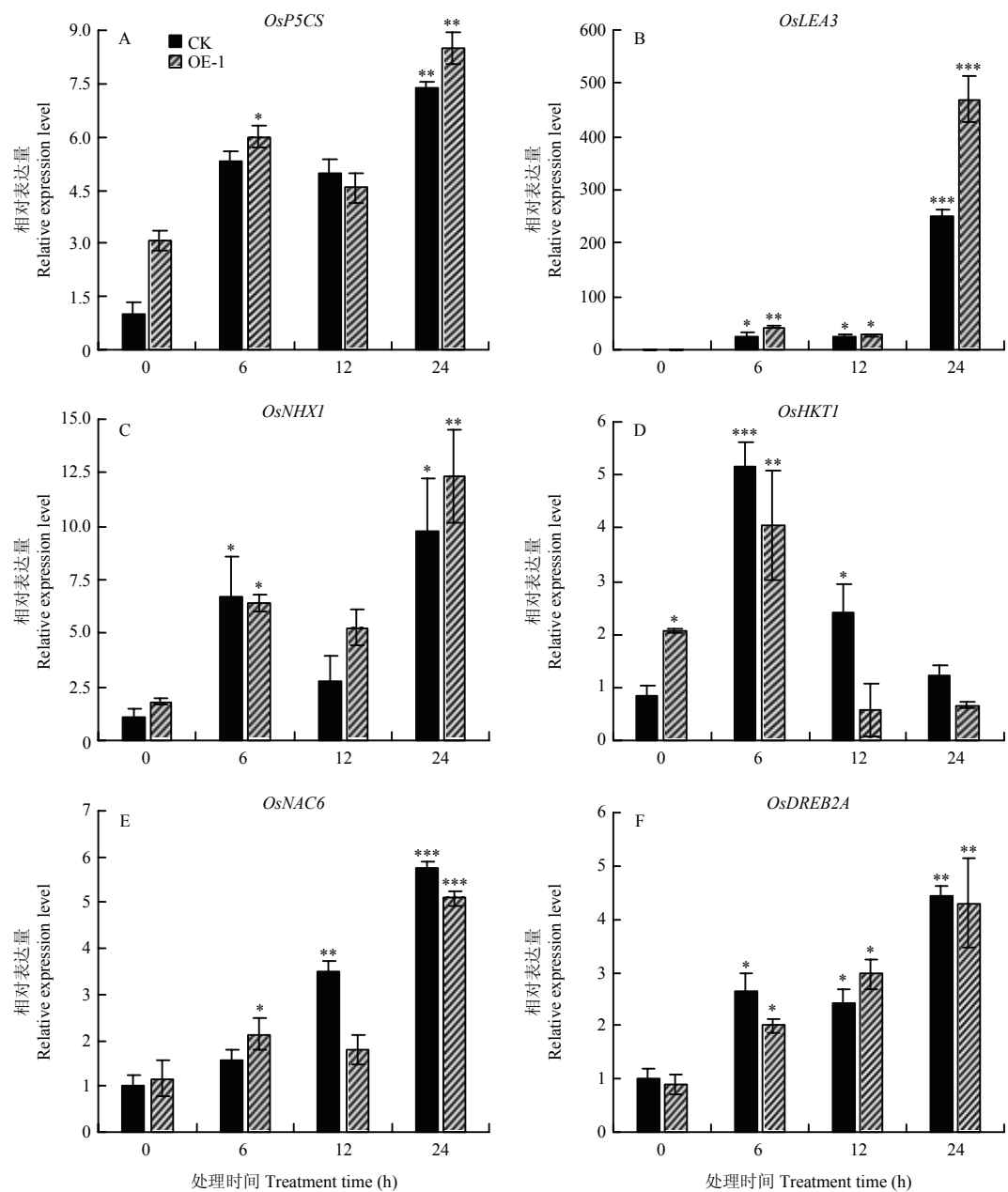


图5 盐处理下各响应基因在对照及 OE-1 中的相对表达量

Fig. 5 The relative expressions of salt responsive genes in control and OE-1 under salinity

3.2 *SiRLK35* 参与水稻耐盐性的响应机制

基因功能的行使是通过对其上下游基因的表达进行响应或调控来完成的。本研究选取了部分盐害响应基因，如 *OsP5CS*、*OsNHX1*、*OsNAC6* 及 *OsDREB2A* 进行了表达模式的测定。其中 *OsP5CS* 是一个双功能基因，编码  $\gamma$ -谷氨酰激酶 ( $\gamma$ -GK) 和谷氨酸-5-半醛脱氢酶 (GSA) 2 种酶，催化谷氨酸合成脯氨酸，过表达 *OsP5CS* 植株表现为较好的根生长和较高的生物

量<sup>[27-28]</sup>；*OsNHX1* 在盐和 ABA 诱导下表达上调，其过表达水稻株系耐干旱和耐盐性显著提高<sup>[29-30]</sup>；*OsNAC6* 及 *OsDREB2A* 作为转录因子，其表达受低温、高盐、干旱胁迫的诱导，超表达该基因能增强水稻对高盐、干旱胁迫的耐受性<sup>[31]</sup>；超表达 *OsDREB2A* 能提高转基因水稻在盐胁迫下的存活率<sup>[32]</sup>。本研究中，各基因在盐胁迫下 OE-1 中均表现出不同程度的响应。其中 *OsLEA3* 在盐胁迫前期响应不明显，但在盐处理 24 h



表现出较高的表达量。已知 *OsLEA3* 编码的蛋白是一种晚期胚胎发育丰富蛋白, 是典型的功能基因, 作为一类低分子量蛋白, 其在细胞中可作为渗透调节剂稳定细胞膜结构, 结合离子和防止过氧化, 该基因的表达受盐、ABA、PEG 及环境胁迫等因素诱导, 且随胁迫程度的提高而表达增强, 在拟南芥、水稻中的高表达可提高植株对盐胁迫的耐受性<sup>[33-35]</sup>。*OsLEA3* 作为具有渗透调节功能的典型基因, 其在盐胁迫下 *SiRLK35* 过表达株系中的高表达在提高受体材料耐盐性的同时, 也显示 *SiRLK35* 对 *OsLEA3* 的表达具有调控作用。本研究中编码高亲和  $\text{Na}^+$  转运蛋白的 *OsHKT1* 的表达虽然在盐处理 6 h 表现为上调, 但之后随盐处理时间的延长而表达降低, 甚至恢复至盐处理前水平<sup>[36]</sup>。已知 *OsHKT1* 表达受  $\text{K}^+$  饥饿诱导, 而  $\text{Na}^+$  的过量积累可迅速下调其表达, 故在  $\text{K}^+$  缺乏的条件下, *OsHKT1* 可特异的介导根吸收  $\text{Na}^+$  作为营养元素供植物生长所需<sup>[37-38]</sup>。过表达 *SiRLK35* 株系和对照在盐处理后 *OsHKT1* 表达模式的变化, 推测其在盐处理初期将  $\text{Na}^+$  转运到细胞内, 当  $\text{Na}^+$  浓度在细胞中积累至毒害水平时其表达迅速下调来减少  $\text{Na}^+$  向细胞内的转运, 从而维持细胞内  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  平衡, 降低盐胁迫造成的离子毒害, 提高植物对盐胁迫的耐受性。综上, 谷子 *SiRLK35* 可提高受体材料的耐盐性, 其主要通过影响过氧化物的清除机制、调控下游胁迫响应基因如 *OsLEA3* 及 *OsHKT1* 等的表达及信号途径来实现的。本研究为培育谷子抗盐新品种提供了候选基因资源。

## 4 结 论

谷子 *SiRLK35* 可参与盐胁迫响应过程, 其过表达株系可通过调控盐胁迫下抗氧化酶活性的变化, 降低过氧化物的积累, 及调控盐害响应基因如 *OsLEA3* 及 *OsHKT1* 等的表达及相关信号途径, 从而提高受体植株的耐盐性。

## References

- [1] YANG Y Q, GUO Y. Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(9): 796-804.
- [2] ROZEMA J, FLOWERS T. Crops for a salinized world. *Science*, 2008, 322(5907): 1478-1480.
- [3] 张建锋, 张旭东, 周金星, 刘国华, 李冬雪. 世界盐碱地资源及其改良利用的基本措施. 水土保持研究, 2006, 12(6): 28-30.

- Soil and Water Conservation*, 2006, 12(6): 28-30. (in Chinese)
- [4] LIU Z X, ZHANG H X, YANG X Y. Effects of soil salinity on growth, ion relations, and compatible solute accumulation of two sumac species: *Rhus glabra* and *Rhus trilobata*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2013, 44(21): 3187-3204.
- [5] 贾冠清, 刁现民. 谷子(*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) 作为功能基因组研究模式植物的发展现状及趋势. 生命科学, 2017, 29(3): 292-301.
- JIA G Q, DIAO X M. Current status and perspectives of researches on foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.): A potential model of plant functional genomics studies. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(3): 292-301. (in Chinese)
- [6] YE Y Y, DING Y F, JIANG Q, WANG F J, SUN J W, ZHU C. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Report*, 2017, 36: 235-242.
- [7] LIM C W, YANG S H, SHIN K H, LEE S C, KIM S H. The *AtLRK10L1.2*, *Arabidopsis*, ortholog of wheat *LRK10*, is involved in ABA-mediated signaling and drought resistance. *Plant Cell Report*, 2015, 34(3): 447-455.
- [8] VAID N, PANDEY P, SRIVASTAVA V K, TUTEJA N. Pea lectin receptor-like kinase functions in salinity adaptation without yield penalty, by alleviating osmotic and ionic stresses and upregulating stress-responsive genes. *Plant Molecular Biology*, 2015, 88(1/2): 1-14.
- [9] LI C H, SUN Y. The receptor-like kinase *SIT1* mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. *The Plant Cell*, 2014, 26(6): 2538-2553.
- [10] ZHANG P Y, ZHANG Z H, WANG J, CONG B L, CHEN K S, LIU S H. A novel receptor-like kinase (PnRLK-1) from the Antarctic Moss *Pohlia nutans* enhances salt and oxidative stress tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 33: 1156-1170.
- [11] SERRA T S, FIGUEIREDO D D, CORDEIRO A M, ALMEIDA D M, LOURENC T, ABREU I A, SEBASTIAN A, FERNANDES L, CONTRERAS M B, OLIVEIRA M M, SAIBO N J M. *OsRMC*, a negative regulator of salt stress response in rice, is regulated by two AP2/ERF transcription factors. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(4/5): 439-455.
- [12] 冯露, 钟理, 陈丹丹, 马有志, 徐兆师, 李连城, 周永斌, 陈明, 张小红. 过表达谷子液泡  $\text{H}^+$ -ATPase E 亚基基因在拟南芥中的耐盐性. 作物学报, 2015, 41(11): 1682-1691.
- FENG L, ZHONG L, CHEN D D, MA Y Z, XU Z S, LI L C, ZHOU Y B, CHEN M, ZHANG X H. Overexpression of vacuole  $\text{H}^+$ -ATPase E subunit gene *SiVHA-E* from Foxtail Millet enhances salt resistance in

- transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(11): 1682-1691. (in Chinese)
- [13] 黄锁, 胡利芹, 徐东北, 李微微, 徐兆师, 李连城, 周永斌, 刁现民, 贾冠清, 马有志, 陈明. 谷子转录因子 SiNF-YA5 通过 ABA 非依赖途径提高转基因拟南芥耐盐性. *作物学报*, 2016, 42(12): 1787-1797.
- HUANG S, HU L Q, XU D B, LI W W, XU Z S, LI L C, ZHOU Y B, DIAO X M, JIA G Q, MA Y Z, CHEN M. Transcription factor SiNF-YA5 from Foxtail Millet (*Setaria italica*) conferred tolerance to high-salt stress through ABA-independent pathway in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(12): 1787-1797. (in Chinese)
- [14] 秦玉海, 张小红, 冯露, 李微微, 徐兆师, 李连城, 周永斌, 马有志, 刁现民, 贾冠清, 陈明, 闵东红. 谷子转录因子基因 *SibZIP42* 在拟南芥中对高盐和 ABA 的响应. *中国农业科学*, 2016, 49(17): 3276-3286.
- QIN Y H, ZHANG X H, FENG L, LI W W, XU Z S, LI L C, ZHOU Y B, MA Y Z, DIAO X M, JIA G Q, CHEN M, MIN D H. Response of Millet transcription factor gene *SibZIP42* to high salt and ABA treatment in transgenic *Arabidopsis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(17): 3276-3286. (in Chinese)
- [15] 李建锐. 谷子 *SiASR4* 基因参与植物响应干旱和盐胁迫的功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- LI J R. Function analysis of the foxtail millet (*Setaria italica*) gene, *SiASR4*, in response to drought and salt stresses of plants[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [16] 王一帆, 李臻, 潘教文, 李颖秀, 王庆国, 管延安, 刘炜. 谷子 *SiRLK35* 基因克隆及功能分析. *遗传*, 2017, 39(5): 413-422.
- WANG Y F, LI Z, PAN J W, LI Y X, WANG Q G, GUAN Y A, LIU W. Cloning and functional analysis of the *SiRLK35* gene in *Setaria italica* L.. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(5): 413-422. (in Chinese)
- [17] 王一帆, 李臻, 潘教文, 王庆国, 刘炜. 谷子类受体蛋白激酶基因 *SiRLK35* 的克隆及原核表达. *山东农业科学*, 2016, 48(9): 1-5.
- WANG Y F, LI Z, PAN J W, WANG Q G, LIU W. Cloning of receptor-like protein kinase gene *SiRLK35* from Foxtail Millet and its prokaryotic expression. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, 48(9): 1-5. (in Chinese)
- [18] KUMAR D, YUSUF M A, SINGH P, SARDAR M, SARIN N B. Modulation of antioxidant machinery in alpha-tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma*, 2013, 250(5): 1079-1089.
- [19] YU J, CHEN S, ZHAO Q, WANG T, YANG C, DIAZ C, SUN G, DAI S. Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10: 3852-3870.
- [20] 岩学斌, 袁金海. 盐胁迫对植物生长的影响. *安徽农业科学*, 2019, 47(4): 30-33.
- YAN X B, YUAN J H. Effects of salt stress on plant growth. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(4): 30-33. (in Chinese)
- [21] 李小波, 潘教文, 丁国华, 李臻, 王庆国, 刘炜. 盐胁迫下谷子根部细胞内 pH 值测定. *山东农业科学*, 2019, 51(2): 40-44.
- LI X B, PAN J W, DING G H, LI Z, WANG Q G, LIU W. Determination of pH value in root cells of Foxtail Millet under salt stress. *Shandong Agricultural Sciences*, 2019, 51(2): 40-44. (in Chinese)
- [22] 封功能, 张雪梅, 仇明, 骆爱兰. 水稻数量性状研究进展. *安徽农业科学*, 2004, 32(6): 1231-1234.
- FENG G N, ZHANG X M, QIU M, LUO A L. Advance in rice quantitative trait loci. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2004, 32(6): 1231-1234. (in Chinese)
- [23] 郑崇珂, 窦玉慧, 解丽霞, 谢先芝. 水稻耐盐相关基因的研究进展. *分子植物育种*, 2017, 15(11): 4411-4422.
- ZHENG C K, DOU Y H, XIE L X, XIE X Z. Research progress on the genes related to salt tolerance in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(11): 4411-4422. (in Chinese)
- [24] 朱巍巍, 马天意, 张梅娟, 沙伟. 类受体蛋白激酶在植物中的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(1): 451-458.
- ZHU W W, MA T Y, ZHANG M J, SHA W. Research progress of receptor-like protein kinases in plants. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(1): 451-458. (in Chinese)
- [25] KUIPER D, SCHUIT J, KUIPER P J C. Actual cytokinin concentration in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant Soil*, 1990, 123(2): 243-250.
- [26] 李金亨, 赵萍萍, 邱宗波. 外源  $H_2O_2$  对盐胁迫下小麦幼苗生理指标的影响. *西北植物学报*, 2012, 32(9): 1796-1801.
- LI J T, ZHAO P P, QIU Z B. Effects of exogenous  $H_2O_2$  on physiological indexes of wheat seedlings under salt stress. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2012, 32(9): 1796-1801. (in Chinese)
- [27] MANIMARAN P, VENKATA R S, MAZAHAR M, RAGHURAMI M, POLI Y, MOHANRAJ S S, BALACHANDRAN S M, KIRTI P B. Activation-tagging in *indica* rice identifies a novel transcription factor subunit, NF-YC13 associated with salt tolerance. *Scientific Reports*, 2017, 24(4): 1-16.
- [28] ANOOP N, GUPTA K. Transgenic *indica* rice CV IR-50 over expressing vigna aconitifolia-pyrroline-5-carboxylate synthetase

- cDNA shows tolerance to high salt. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 12(2): 109-116.
- [29] FUKUDA A, NAKAMURA A, HARA N, TOKI S, TANAKA Y. Molecular and functional analyses of rice NHX-type  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter genes. *Planta*, 2011, 233(1): 175-188.
- [30] LIU S P, ZHENG L Q, XUE Y H, ZHANG Q, WANG L, SHOU H X. Overexpression of OsVP1 and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice. *Journal of Plant Biology*, 2010, 53(6): 444-452.
- [31] NAKASHIMA K, TRAN L S, VAN N D, FUJITA M, MARUYANA K, TODAKA D, HAYASHI N, SHINOZAKI K, YAM S K. Functional analysis of a NAC type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 2007, 51(4): 617-630.
- [32] CUI M, ZHANG W J, ZHANG Q, XU Z Q, ZHU Z G, DUAN F P, WU R. Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(12): 1384-1391.
- [33] MOONS A, BAUW G, PRINSEN E, VAN M M, VAN D S D. Molecular and physiology responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant *indica* rice varieties. *Plant Physiology*, 1995, 107(1): 177-186.
- [34] DUAN J L, CAI W M. *OsLEA3-2*, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance, *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e45117.
- [35] HU T Z. *OsLEA3*, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. *Plant Physiology*, 2008, 55(4): 530-537.
- [36] KADER M A, SEIDEL T, GOLLDACK D, LINDBERG S. Expressions of *OsHKT1*, *OsHKT2*, and *OsVHA* are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(15): 4257-4268.
- [37] NATSUKO I K, NAOKI Y, HIROKI Y, KAORU O, HIROKI U, ALEX C, KEITARO T, HIDEO M, MIHO F K, TOMOKI H. *OsHKT1;5* mediates  $\text{Na}^+$  exclusion in the vasculature to protect leaf blades and reproductive tissues from salt toxicity in rice. *The Plant Journal*, 2017, 91: 657-670.
- [38] WANG R, JING W, XIAO L, JIN Y, SHEN L, ZHANG W. The *OsHKT1;1* transporter is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-Type transcription factor. *Plant Physiology*, 2015, 168(3): 1076-1090.

(责任编辑 李莉)